

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 10 日現在

機関番号：32713

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22791555

研究課題名（和文） 嚢胞状卵胞の形成メカニズム：単一卵胞培養系を用いた解析

研究課題名（英文） The formation mechanism of the cystic follicle: analysis using a single follicle culture system

研究代表者

奥津 由記（OKUTSU YUKI）

聖マリアンナ医科大学・医学部・助教

研究者番号：00509903

研究成果の概要（和文）：

アンドロゲン投与による単位卵胞あたりの変化を分子生物学的に解析するため、単一卵胞培養系を確立し、単一卵胞あたりのアンドロゲンの影響を解析した。その結果、アンドロゲン添加により卵胞生存率の低下、卵母細胞の形態異常と成熟率の減少が確認された。さらにアンドロゲン添加培養した卵母細胞では染色体が赤道上に集まらず紡錘糸が確認できなかったことにより、過剰なアンドロステンジオンが紡錘体形成に異常を起こすことが判明した。

研究成果の概要（英文）：

To analyze the molecular biological changes in the follicle, we establish a single follicle culture system and analyzed the effect of androgen per single follicle. As a result, the decrease in survival follicle by the addition of androgen and morphological abnormalities of the oocyte was confirmed. Chromosomes in oocytes does not converge on the equator, spindle fibers could not be confirmed. Therefore, it was found that the androgen excess causes abnormalities in spindle formation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：生殖医学

1. 研究開始当初の背景

卵巣は、卵形成、排卵、黄体形成の場であるとともに、ホルモンを分泌する内分泌腺である。卵巣におけるエストロジオールやプロゲステロンなどの数種のホルモンの分泌量は卵形成、排卵、黄体形成に伴って変化する。卵形成は下垂体前葉から分泌される生殖線刺激ホルモン（卵胞刺激ホルモンと黄体化ホルモン）、卵巣自身から分泌されるパラクラインファクターとオートクラインファクターなどの作用によって進行する。この卵形成は、卵母細胞、卵胞上皮細胞、顆粒膜細胞、莢膜細胞から構成される卵胞と呼ばれる構造体の中で進行する。卵胞の発育過程においては主として卵胞上皮細胞の細胞分裂による増殖と卵胞腔の形成が起こり、卵胞は原始卵胞 → 一次卵胞 → 二次卵胞 → 胞状卵胞へと発達する。卵胞の構造が発達するのに伴って、卵母細胞も発育、成熟する (Sirard MA, Theriogenology 2007; Hussein MR, Hum Reprod Update 2005; Picton HM et al, Reproduction 2008)。

多嚢胞性卵巣症候群 (polycystic ovary syndrome : PCOS) は生殖年齢女性の 5~10% が発症する頻度の高い疾患で (Jonard S et al, Hum Reprod Update 2004; Ehrmann DA, N Engl J Med 2005)、卵巣の多嚢胞性変化と排卵障害をもたらす。PCOS の組織学的特徴は、卵巣内に発育を停止した小卵胞が多数存在することである。アンドロゲンは、黄体化ホルモンにより刺激された莢膜細胞によりプロゲステロンから合成されるステロイドホルモンである (Magoffin DA, Int J Biochem Cell Biol 2005)。このホルモンは、PCOS 患者卵巣由来の莢膜細胞で過剰に分泌される (Gilling-Smith C et al, Clin Endocrinol 1997)、また PCOS 患者の血清や卵胞液中のア

ンドロゲン濃度は、健常者のそれらに比べて高いことが報告されている (Naessen T et al, Fertil Steril 2010; Codner E et al, J Clin Endocrinol Metab 2007)。このため、PCOS の主な原因は、卵巣局所のアンドロゲン過剰状態であると考えられている。しかし、アンドロゲンによる卵胞の嚢胞化を誘導する作用機所は未だ解明されていない。

我々の研究チームが行ったアンドロゲン過剰投与ラットを用いた実験では、アンドロゲン (アンドロステンジオン) を思春期前から連日投与すると性周期は停止し、卵胞は嚢胞状に変化した (Okutsu Y et al, Fertil Steril 2010)。これらは、PCOS の主な原因はアンドロゲンによるものだというを示唆している。さらに、この研究で明らかになったことは、卵胞の嚢胞化において卵母細胞は萎縮、消失し、嚢胞化の前段階として、顆粒膜細胞では P450aroma (cytochrome P450 aromatase) の発現が減弱し、P450scc (cytochrome P450 side-chain cleavage) の発現が増強したということである。P450scc は顆粒膜細胞が黄体化する時に発現開始する酵素であり (Robker RL et al, Mol Endocrinol 1998; Pangas SA et al, Mol Endocrinol 2006)、卵胞はアンドロゲン過剰投与により卵胞形態を保ったまま黄体化に似た変化を起こす可能性が示された。

卵巣の機能単位は卵胞であり、卵巣はさまざまなステージの卵胞の集合体であるため、アンドロゲンが個々の卵胞に対して及ぼす影響を定量的に解析することは難しい。その問題を解決するためには、体外で卵胞を培養する技術が必要である。この技術の確立を目的とした研究では、げっ歯類、特にマウスが動物実験として用いられている。なかでも、Eppig らは原始卵胞の状態から体外培養を行

い、成熟卵に対して約 5%と出生率は高いとはいえないものの産仔を得ることに成功している (Eppig JJ et al, Biol Reprod 1996; O' Brein MJ et al, Biol Reprod 2003)。この単一卵胞培養系は *in vivo* 等の他の実験系と比較して非常に単純化された環境で解析を行うことができ、卵胞に対するさまざまな因子の直接的な影響を解明できる可能性がある (Demeestere I et al, Reproduction 2005)。また、Zhao らは卵胞を単一で培養した群と 4~6 個のグループで培養を行った群を比較したところ、後者の方が有意に卵胞の生存率や成長が良好であったと報告している (Zaho J et al, Mol Reprod Dev 2000)。このことは卵胞間における相互作用を考慮しなくてもよい単一培養系の確立とそれによる評価を行うことが有効であると考えられる。したがって、単一卵胞培養系は卵胞を構成する卵母細胞および顆粒膜細胞、莢膜細胞という限られた細胞間での相互作用を解析するうえで有用と考えられる。

2. 研究の目的

(1) 単一卵胞培養ができるより良い環境を作成し、二次卵胞以降の安定した体外培養系を確立する。

(2) 確立した卵胞培養系を用いて、過剰なアンドロゲンが卵巣内の卵胞発育に対して及ぼす影響を *in vitro* で再現し、単位卵胞あたりの変化を分子生物学的に解析する。そのことにより、アンドロゲンが排卵障害を引き起こすメカニズムを解明する。

3. 研究の方法

従来の方法を用いて卵胞培養は 1 個の卵胞を 1 個の培養液の drop で培養することにより、個々の評価が可能である。また、添加物質を変化させることにより、それぞれの卵胞単位の直接作用が検証できる。本研究では、

in vitro の卵胞培養系実験を追加し、*in vivo* で得られた仮説をより詳細に検証することで、PCOS 発症メカニズム (特に卵胞発育が停止するメカニズム) を解明する。さらに原始卵胞の培養には組織培養が優れていることが報告されている。培養液の再構成と培養環境を改善することで、より安定した卵胞培養系を作成する。

(1) 基本的な培養方法は従来の報告から、培養メディアムの組成は α -MEM に 1% ITS、100mIU/ml rFSH、ゲンタマイシンを加え、FBS を使用する。さらに、卵胞成長に必要なパラクライン・オートクラインファクターが報告されており、このような分子を用いて、卵胞成長に最適な培養条件を確立する。卵母細胞の最大直径を成熟の指標とし、排卵刺激を行うための最適な培養期間を検討する。そして、効率良く成熟卵を得ることを目指す。

(2) 単一卵胞培養系に生理学的濃度のアンドロステンジオン、ジヒドロテストステロン、エストラジオールを投与し、卵胞の大きさ、卵子の大きさ、卵胞の生存率、メディアム中のステロイドホルモン濃度、卵母細胞の成熟率、紡錘体の形成についてデータを採取する。さらに、顆粒膜細胞の早期黄体化やその後のアポトーシスを検出するために、マーカー分子である P450_{scc} を用いて免疫染色 (IHC) や TUNEL 法を用いる。また、電子顕微鏡施設を利用し、形態学的変化を観察する。

4. 研究成果 成果

(1) 従来の単一卵胞培養には方法上に問題点が残っていたため、我々は従来の方法 (Cortvrindt and Smitz, 2002) に様々な改良を加え、oil free の 96 穴シャーレでの培養法を確立した。この方法では oil による影響を排除することができ、より厳密な単一卵胞の微小環境を再現できる。この単一卵胞培

養技術を用いて我々は、単位卵胞あたりのアンドロゲンの影響を解析した。マウスから二次卵胞を採取し、成熟卵胞まで体外で培養し、排卵刺激にて成熟した卵母細胞を確認した。その結果、アンドロゲン添加により卵胞生存率は低下し、卵母細胞の形態異常と成熟率の減少が確認された。この研究の結果、アンドロゲンは成長中の卵胞の卵母細胞や顆粒膜細胞に作用し、これらの異常を誘導する。そして減数分裂の再開を妨害し、卵母細胞を変性させることが判明した。

(2) 過剰なアンドロステンジオン環境で培養した卵胞を電子顕微鏡で観察した結果、細胞内小器官の数と形態に明らかな変化を認めた。androstenedione を添加して培養した卵胞の顆粒膜細胞は、脂肪滴を多く含み、ミトコンドリアのクリスタが管状に変化し、ゴルジ体が発達しており、多数のリボソームが存在した。これらの androstenedione 添加による細胞内小器官の変化は顆粒膜細胞の黄体化に類似する変化である。我々が以前報告した *in vivo* での研究においてもアンドロゲンにより卵胞の早期黄体化が起こっており、高アンドロゲン環境下では顆粒膜細胞が早期に黄体化する可能性が示された。

(3) さらに、過剰なアンドロステンジオンにより変性した卵母細胞では紡錘体形成に異常を起こすことを確認した。アンドロゲン添加培養した卵母細胞では染色体が赤道上に集まらず、紡錘糸が確認できなかった。紡錘糸は微小管形成中心を起点にチューブリンの重合により伸長していく。この紡錘糸は最終的に染色体上の動原体に結合し、紡錘体を形成する。このため、微小管形成中心に異常が起こることは、紡錘体形成を阻害することになるのかもしれない。また、第一減数分裂は相同染色体が均等に第一極体と卵母細胞に分配されるが、アンドロステンジオン投与

された群では染色体の不均等な分配が確認された。この観察された結果は、アンドロステンジオンによって卵母細胞の正常な MAD2 の発現や局在が妨害された可能性を示唆している。これらを証明するために、MAD2 をリアルタイム PCR や IHC を用いて検出する。さらに、染色体の不均等な分配を確認するために、第一極体放出後の卵母細胞を用いて、染色体数の確認を行うことも今後考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Tarumi W, Tsukamoto S, Okutsu Y, Takahashi N, Horiuchi T, Itoh MT, Ishizuka B. Androstenedione induces abnormalities in morphology and function of developing oocytes, which impairs oocyte meiotic competence. *Fertility and Sterility*. 97 (2) : 469-476. 2012 査読 (あり)

[学会発表] (計 2 件)

- ① Tarumi W, Tsukamoto S, Okutsu Y, Takahashi N, Horiuchi T, Itoh MT, Ishizuka B. Androstenedione induces abnormalities in morphology and function of developing oocytes, which impairs oocyte meiotic competence. 16th World Congress on In Vitro Fertilization. Tokyo. Keio Plaza Hotel. September 11-13, 2011.
- ② 樽見航、塚本早苗、奥津由記、堀内俊孝、伊藤正則、石塚文平 卵胞発育と成熟に対するアンドロゲンの影響、第 55 回日本生殖医学会総会・学術講演会、2010 年 11 月 11 日、徳島あわぎんホール

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥津 由記 (OKUTSU YUKI)
聖マリアンナ医科大学・医学部・助教
研究者番号：00509903

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし